

Mia Švitek¹, Dunja Čosić², Mirela Varga¹,
Lara Ergović¹, Karolina Vrandečić¹

Izvorni znanstveni rad

Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Fusarium culmorum*

Sažetak

Provedeno je *in vitro* istraživanje antifungalnog djelovanja šest vrsta eteričnih ulja (limun, naranča slatka, bor planinski, ružmarin, timijan i anis zvjezdasti) na polifagnu fitopatogenu gljivu *Fusarium culmorum*. Eterična ulja primijenjena su u količinama da volumni udio ulja u zraku bude 0,02, 0,06 i 0,1 %. Rezultati istraživanja pokazuju da biološka aktivnost eteričnih ulja ovisi o vrsti i primijenjenoj količini ulja. Eterično ulje timijana potpuno je inhibiralo rast gljive pri svim primijenjenim količinama i bez obzira na duljinu inkubacije. Značajno antifungalno djelovanje imalo je i ulje anisa. Najslabije antifungalno djelovanje imalo je ulje naranče slatke u svim tretmanima.

Ključne riječi: eterična ulja, porast micelija, *Fusarium culmorum*

Uvod

Fitopatogene gljive uzrokuju smanjenje ili potpuni gubitak prinosa i kvalitete, čime proizvođačima nanose velike ekonomske štete. *Fusarium* vrste pripadaju ekonomski najznačajnijim uzročnicima kultiviranog bilja, a jedna od najdestruktivnijih vrsta je *Fusarium culmorum* (W. G. Smith) Sacc. *F. culmorum* je iznimno značajan patogen strnih žita, kukuruza, sirka i drugih biljnih vrsta iz porodice trava na kojima, ovisno o dijelu biljke koji je zaražen, izaziva različite tipove bolesti kao što su trulež sjemena, propadanje klijanaca, trulež korijena, trulež stabljike, palež klasova ili trulež klipa.

Primjena kemijskih fungicida i danas je najučinkovitiji i najlakše primjenjiv način zaštite protiv velikog broja uzročnika biljnih bolesti. S druge strane, a unatoč njihovoj učinkovitosti, česta uporaba kemijskih fungicida ima veoma značajne nedostatke poput opasnosti pri rukovanju, ostataka u hrani, stočnoj hrani i tlu, pojave rezistentnosti na pojedine aktivne tvari, poremećaja ravnoteže ekosustava i prijetnje ljudskom zdravlju (Palfi, 2017.). Svi navedeni negativni učinci fungicida ukazali su na potrebu za alternativnim nekemijskim metodama zaštite bilja. Kako bi se pronašli novi i ekološki prihvatljivi biofungicidi, provode se mnoge studije vezane uz antifungalne učinke alternativnih proizvoda (Combrinck i sur., 2011., Duduk i sur., 2015., Sharma i sur., 2017., Nguyen i sur., 2017.).

Biološki spojevi ekstrahirani iz biljaka mogli bi biti jedna od najvažnijih alternativa koja nema štetnih učinaka na ljudsko zdravlje i okoliš u cjelini. Eterična ulja su sekundarni me-

1 **Mia Švitek**, mag. ing. agr., studentica, **Mirela Varga**, mag. ing. agr., **Lara Ergović**, mag. ing. agr. prof. dr. sc. **Karolina Vrandečić**, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, V. Preloga 1, 31000 Osijek, Hrvatska

2 **Dunja Čosić**, mag. math., III gimnazija Osijek, Kamila Firingera 14, 31000 Osijek, Hrvatska
Autor za korespondenciju: kvrandecic@fazos.hr

taboliti biljaka iznimno važni za njihovu obranu jer često posjeduju antimikrobna svojstva (Hyldgaard i sur. 2012.). Ona smanjuju rast micelija gljiva, uzrokuju promjene u sastavu stanične stjenke patogena i potiču njihovu razgradnju, uzrokuju dezorganizaciju mitohondrijske strukture i poremećaje transporta elektrona i transporta protona te utječu na fosforilaciju (Knobloch, 1989.). Kemijski sastav eteričnih ulja je veoma složen i ovisi o vrsti i dijelu biljke iz kojeg se uzima, podrijetlu, vremenu žetve ili berbe i prerade, kao i o uvjetima skladištenja (Burt, 2004., Tajkarimi i sur. 2010.). Eterična ulja mogu sadržavati više od 60-tak različitih spojeva, od kojih su dva ili tri glavna spoja u visokim koncentracijama, a ostali spojevi se u ulju nalaze u tragovima (Bakkali i sur., 2008.). Istraživanja ukazuju da spojevi koji su zastupljeni u veoma malim koncentracijama mogu imati ključnu ulogu u antimikrobnim svojstvima i to najvjerojatnije zbog sinergijskih učinaka s drugim komponentama iz ulja (Burt, 2004.).

Cilj ovoga istraživanja je bio utvrditi volatilno antifungalno djelovanje različitih eteričnih ulja u *in vitro* uvjetima na rast patogene gljive *Fusarium culmorum*.

Materijali i metode rada

Istraživanje volatilnog učinka eteričnih ulja na porast micelija fitopatogene gljive *Fusarium culmorum* provedeno je u Centralnoj agrobiotehničkoj analitičkoj jedinici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek.

Pokus je postavljen u tri ponavljanja prema disk difuzijskoj metodi (Edris i Farrag, 2003.). U istraživanju su korištena eterična ulja: limun (*Citrus limon* L.), naranča slatka (*Citrus aurantium* L. var. *dulcis* L.), bor planinski (*Pinus mugo* Turra.), ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), timijan (*Thymus vulgaris* L.) i anis zvjezdasti (*Illicium verum* Hook. f.) u količinama da volumni udio ulja u zraku bude 0,02, 0,06 i 0,1 %. U sredinu Petrijevih zdjelica ($V = 65$ mL) s 15 mL KDA podloge (krumpir-dekstrozni agar) postavlja se kružni isječak micelija (4 mm) starosti 7 dana, a na poklopac na sterilni filter papir promjera 7 mm aplicira se eterično ulje kako bi se dobio pokusom predviđeni volumni udio ulja u zraku.

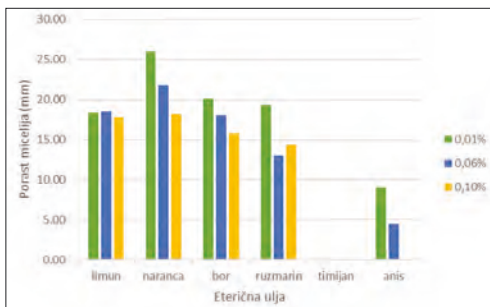
Petrijeve zdjelice stavljene su u termostat komoru na temperaturu 22 °C, relativnu vlagu zraka 70 % i režim svjetla 12 sati svjetlo / 12 sati tama pri čemu se prati rast micelija gljive (mm). Porast micelija mjeri se nakon 48, 120 i 168 sati od inokulacije.

Svi dobiveni podaci obrađeni su u statističkom programu R (verzija 4.3.1). Podaci su analizirani Kruskal-Wallis testom i Dunn testom na razini $p < 0,05$.

Iz tretmana gdje posljednjim mjerenjem nije utvrđen nikakav porast gljive uzima se kružni isječak s micelijem i prenosi u novu Petrijevu zdjelicu s KDA podlogom (bez ulja). Tako pripremljeni uzorci se drže 48 sati u termostat komori na 22 °C. Ukoliko je gljiva nakon inkubacije počela razvijati micelij učinak ulja se označava fungistatičan, a ukoliko nema razvoja novog micelija učinak ulja je fungicidan. Najniža koncentracija (količina) ulja pri kojoj je utvrđen fungicidni učinak označava se kao minimalna fungicidna koncentracija (MFC).

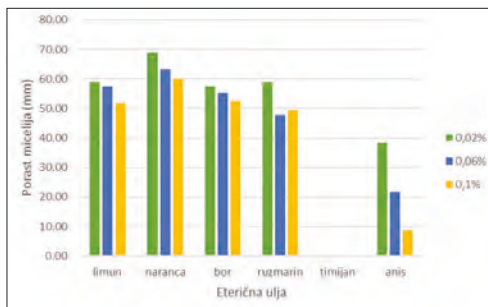
Rezultati i rasprava

Rezultati provedenog istraživanja porasta micelija gljive *F. culmorum* uz primjenu eteričnih ulja u tri različite količine nakon 48, 120 i 168 sati pokazuju da antifungalni učinak ulja ovisi o vrsti eteričnog ulja i primijenjenoj količini (grafikon 1., 2. i 3.). Eterično ulje timijana u svim primijenjenim količinama potpuno je inhibiralo rast gljive i nakon 168 sati. Kod ostalih ulja i u svim primijenjenim količinama utvrđen je rast micelija *F. culmorum*.



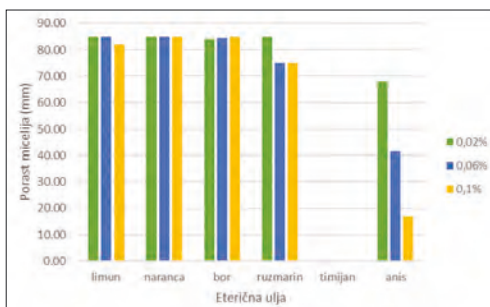
Grafikon 1. Prosječni porast micelija *Fusarium culmorum* nakon 48 sati

Graph 1. Average mycelial growth of *Fusarium culmorum* after 48 hours



Grafikon 2. Prosječan porast micelija *Fusarium culmorum* nakon 120 sati

Graph 2. Average mycelial growth of *Fusarium culmorum* after 120 hours



Grafikon 3. Prosječan porast micelija *Fusarium culmorum* nakon 168 sati

Graph 3. Average mycelial growth of *Fusarium culmorum* after 168 hours

Analizom podataka dobivenih mjerenjem porasta micelija nakon 48 sati utvrđeno je da postoje statistički značajne razlike pri korištenju različitih eteričnih ulja kada je volumni udio ulja u zraku 0,02 odnosno 0,06 i 0,1 %. Isto je utvrđeno i mjerenjem porasta micelija nakon 120 i 168 sati.

Nakon 48 sati, a kada je volumni udio ulja u zraku 0,02 % i 0,1 % statistički značajno veći porast micelija utvrđen kod ulja naranče u odnosu na timijan i anis. Ukoliko je volumni udio ulja 0,06 % porast micelija u tretmanu s uljem naranče bio je značajno veći u odnosu na porast micelija u tretmanu s uljem timijana. Za ostala ulja nisu utvrđene statistički značajne razlike.

Mjerenjem porasta micelija nakon 120 sati pri volumnom udjelu ulja 0,02 i 0,1 % porast micelija bio je značajno veći pri primjeni ulja naranče u odnosu na tretmane s uljima timijana i anisa. Pri volumnom udjelu ulja 0,06 % porast micelija je bio značajno slabiji kod primjene ulja timijana u odnosu na limun i naranču te kod primjene ulja anisa u odnosu na ulje naranče.

Nakon 168 sati pri volumnom udjelu ulja 0,02 % gljiva je pri primjeni ulja limuna, naranče i ružmarina statistički značajno bolje rasla u odnosu na varijantu pokusa s uljem timijana. Kada je volumni udio ulja u zraku bio 0,06 % gljiva je značajno bolje rasla u prisustvu ulja limuna i naranče u odnosu na rast uz primjenu ulja timijana, a pri volumnom udjelu ulja 0,1 % timijan je imao značajno jače antifungalno djelovanje u odnosu na ulja naranče i bora. Jako antifungalno djelovanje eteričnih ulja timijana i anisa na različite uzročnike bolesti biljaka kao što su *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., *Phytophthora capsici* Leonian, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. te neke *Fusarium* i *Diaporthe/Phomopsis* vrste utvr-

đeno je i u brojnim drugim istraživanjima (De i sur., 2002., Ćosić i sur., 2010., Bi i sur., 2012., Tanović i sur., 2015., Sarkosh i sur., 2017.). Obzirom da antifungalni učinak eteričnih ulja ovisi i o ciljanom organizmu u znanstvenoj literaturi nalazimo i podatke o veoma slabom ili nikakvom antifungalnom učinku. Ćosić i sur. (2010.) navode da eterično ulja anisa nije imalo supresivni učinak na rast micelija *Fusarium graminearum* Schw., a ulje timijana na rast *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk., dok Bullón i Goggi (2005.) navode da ulja timijana i anisa nisu djelovala negativno na rast različitih vrsta iz roda *Phomopsis*.

Viuda-Martos i sur. (2008.), Duduk i sur. (2015.), Palfi (2017.), Li i sur. (2017.) i Shybat i sur. (2021.) navode da se supresivno djelovanje eteričnih ulja u pravilu pojačava s povećanjem primijenjene količine ulja. U našem istraživanju 48 sati nakon nacjepljivanja za ulja naranče, bora i anisa utvrđen je značajno slabiji rast micelija u tretmanu s najvećom primijenjenom količinom ulja (volumni udio ulja u zraku 0,1 %) u odnosu na tretman s najmanjom količinom (volumni udio ulja u zraku 0,02 %). Nakon 120 sati isto je utvrđeno za ulja limuna, naranče, bora i anisa, a nakon 168 sati samo za ulje anisa. Za ulje ružmarina utvrđene su značajne razlike između tretmana s najmanjom i srednjom količinom (volumni udio ulja u zraku 0,06 %).

Za ulje timijana koje je 168 sati od inokulacije potpuno inhibiralo porast gljive utvrđeno je da je učinak ulja u tretmanu u kojem je volumni udio ulja u zraku 0,02% fungistatičan, a u tretmanima u kojima je volumni udio ulja u zraku 0,06 i 0,1 % fungicidan. Navedeni rezultati ukazuju da se količina ulja pri kojoj je volumni udio ulja timijana u zraku 0,06 % može označiti kao minimalna fungicidna koncentracija.

Zaključak

Na temelju istraživanja utjecaja šest eteričnih ulja primijenjenih u trima količinama (volumni udio ulja u zraku 0,01 %, 0,06 % i 0,1 %) na rast micelija fitopatogene gljive *Fusarium culmorum* može se zaključiti da učinak ulja ovisi o vrsti eteričnog ulja i primijenjenoj količini. U pravilu se antifungalno djelovanje ulja povećava s povećanjem primijenjene količine. U našem istraživanju najjače antifungalno djelovanje imala su ulja timijana i anisa. Obzirom da istraživana eterična ulja pokazuju određeno antifungalno djelovanje potrebna su daljnja istraživanja u *in vitro* i *in vivo* uvjetima što bi moglo dovesti do razvoja učinkovitih formulacija ekološki prihvatljivih sredstava za suzbijanje uzročnika biljnih bolesti.

Literatura

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008)** Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2), 446-475.
- Bi, Y., Jiang, H., Hausbeck, M.K., Hao, J.J. (2012)** Inhibitory effects of essential oils for controlling *Phytophthora capsici*. *Plant disease*, 96 (6), 797-803. DOI: 10.1094/PDIS-11-11-0933
- Bullón, G.G., Goggi, A.S. (2005)** Use of Plant-Made Essential Oils as Biological Seed Treatment in Soybean. Iowa State University, USA.
- Burt, S. (2004.)** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiol.*, 94 (3), 223-253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Combrinck, S., Regnier, T., Kamatou, G.P.P. (2011)** In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*, 33 (2), 344-349. DOI: 10.1016/j.indcrop.2010.11.011
- Ćosić, J., Vrandečić, K., Poštić, J., Jurković, D., Ravlić, M. (2010)** In vitro antifungal activity of essential oils on growth of phytopathogenic fungi. *Poljoprivreda*, 16(2), 25-28.
- De, M., De, A.K., Sen, P., Banerjee, A.B. (2002)** Antimicrobial Properties of Star Anise (*Illicium verum* Hook f). *Phytotherapy Research*, 16 (1), 94-95. DOI: 10.1002/ptr.989

Duduk, N., Marković, T., Vasić, M., Duduk, B., Vico, I., Obradović, A. (2015) Antifungal Activity of Three Essential Oils against *Colletotrichum acutatum*, the Causal Agent of Strawberry Anthracnose. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18 (3), 529-537. DOI: 10.1080/0972060X.2015.1004120

Edris, A. E., Farrag, E. S. (2003) Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Nahrung/Food*, 47 (2), 117-121. DOI: 10.1002/food.200390021

Hyltdgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L. (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3 (12), 1-24. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00012

Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., Weis, N. (1989) Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1, 119-128. DOI: 10.2174/0929867033457719

Li, Y., Shao, X., Xu, J., Wei, Y., Xu, F., & Wang, H. (2017). Effects and possible mechanism of tea tree oil against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* in vitro and in vivo test. *Canadian journal of microbiology*, 63(3), 219-227. DOI: 10.1139/cjm-2016-0553

Nguyen, P.A., Strub, C., Fontana, A., Schorr-Galindo, S. (2017) Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. *Biological Control*, 104, 10-27. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2016.10004

Palfi, M. (2017) Antifungalno djelovanje eteričnih ulja i njihovih komponenti na fitopatogene gljivice u in vitro uvjetima. *Doktorski rad. Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku i Institut Ruđer Bošković Zagreb.*

Sarkhosh, A., Schaffer, B., Vargas, A.I., Palmateer, A.J., Lopez, P., Soleymani, A., Farzaneh, M. (2017) Antifungal activity of five plant-extracted essential oils against anthracnose in papaya fruit. *Biological Agriculture & Horticulture*, 43 (1), 18-26. DOI: 10.1080/01448765.2017.1358667

Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S., Kundu, B. (2017) Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123 (3), 308-313. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.09.011

Shybat, Z.L., Abdoul-latif, F.M., Ainane, A., Tarik, A. (2017) Antifungal activity of the essential oils of the Moroccan myrtle (*Myrtus communis* L.). application in agriculture. *Pharmacologyonline*, 2, 485-491.

Tajkarimi, M.M., Ibrahima, S.A., Cliver, D.O. (2010) Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21 (9), 1199-1218. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.02.003

Tanović, B., Milijašević, S., Todorović, B., Potočnik, I., Rekanović, E. (2005) Toxicity of essential oils to *Botrytis cinerea* Pers. in vitro. *Pesticidi i fitomedicina*, 20 (2), 109-114.

Vuđa-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. (2008) Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food control*, 19 (12), 1130-1138. DOI: 10.1016/j.foodcont.2007.12.003

Prispjelo/Received: 22.1.2024.

Prihvaćeno/Accepted: 2.4.2024.

Original scientific paper

The effect of essential oils on the mycelium growth of *Fusarium culmorum*

Abstract

An in vitro study of the antifungal effect of six essential oils (lemon, sweet orange, mountain pine, rosemary, thyme and star anise) on the polyphagous phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum* was carried out. Essential oils were applied in quantities so that the volume fraction of oil in the air was 0.02, 0.06 and 0.1 %. The research results showed that the biological activity of essential oils depended on the type and amount of oil applied. Thyme essential oil completely inhibited the growth of the fungus at all applied amounts and regardless of the length of incubation. Anise oil also had a significant antifungal effect. Sweet orange oil had the weakest antifungal effect in all treatments.

Keywords: Na-hidrogenacarbonate, basic substances, powdery mildew, organic agriculture